Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H. Sies)

ATP-, ADP-GEHALTE IM MITOCHONDRIALEN UND CYTOSOLISCHEN KOMPARTIMENT DER LEBER "IN VIVO" – FRAKTIONIERUNG DES LEBERGEWEBES IN NICHT WÄSSRIGEN MEDIEN –

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
WOLFGANG-DIETRICH SCHWENKE
1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535703_0009

Aus dem Institut für
Physiologische Chemie I
der Unversität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H. Sies)

ATP-, ADP- GEHALTE IM MITOCHONDRIALEN UND CYTOSOLISCHEN KOMPARTIMENT DER LEBER "IN VIVO"

- FRAKTIONIERUNG DES LEBERGEWEBES IN NICHT WÄSSRIGEN MEDIEN -

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Wolfgang-Dietrich Schwenke

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. H.T. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. H. Sies

Korreferent
gez.: Prof. Dr. E. Noack

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	E i n l e i t u n g	1
2.	M e t h o d e n	5
2.1.	Gewinnung des Lebergewebes "in vivo"	5
2.1.1.	mit Narkose	5
2.1.2.	ohne Narkose	6
2.2.	Fraktionierung des Lebergewebes in organischen Lösungsmitteln modifiziert für die Leber "in vivo"	6
2.3.	Isoliert perfundierte Leber	11
2.4.	Testverfahren	11
2.5.	Material	11
3.	E r g e b n i s s e	12
3.1.	Ergebnisse der Fraktionierung in nicht wässrigen Medien - die subzelluläre Verteilung der Metabolite ATP, ADP	12
3.1.1.	Gefütterte Tiere, keine Narkose	12
3.1.2.	Gehungerte Tiere, keine Narkose	15
3.1.3.	Wiedergefütterte Tiere, keine Narkose	16
3.1.4.	Narkotisierte Tiere	16
3.2.	Wirkung von Ketanest und Nembutal in der isoliert perfundierten Rattenleber	18

		Seite
4.	D i s k u s s i o n	22
4.1.	Methodik	22
4.2.	Einfluß der Narkose mit Nembutal, bzw. Ketanest auf isolierte Mitochondrien, isoliert perfundierte Rattenleber und die Leber "in vivo"	27
4.2.1.	Einfluß der Narkose auf isolierte Mitochondrien und isoliert perfundierte Leber	27
4.2.2.	Einfluß der Narkose auf die subzelluläre Verteilung von ATP, ADP der Leber "in vivo"	30
4.3.	Subzelluläre Verteilung der Metabolite ATP, ADP in der Leber "in vivo" ohne Narkose	31
4.3.1.	Sauerstoffversorgung der isoliert perfundierten Leber, der isolierten Hepatocyten und der Leber "in vivo"	31
4.3.2.	Beziehung zwischen der Aktivität des Adeninnukleotidtranslokators und dem mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten	36
5.	Zusammenfassung	40
6.	Verzeichnis der Abkürzungen	42
7.	Literaturangaben	43

1. Einleitung

Die Eukaryontenzelle zeigt eine Aufteilung durch Membranen in bestimmte Kompartimente. Einer dieser durch Membranen begrenzten Räume ist das Mitochondrium. Diese Organelle beinhaltet hauptsächlich Energie liefernde Stoffwechselwege wie Citrat-Cyclus, ß- Oxidation, Atmungskette; daher resultiert die Bezeichnung "Kraftwerk der Zelle".
Die Bakterien- ähnliche Proteinbiosynthese des Mitochondriums, eigene RNS, DNS, Translations- und Transskriptionsenzymsysteme lassen vermuten, daß einst das aerobe Mitochondrium in die Anaerobierzelle einwanderte. Diese Symbiose ermöglichte die vollständige Oxidation der Metabolite zu CO_2 und H_2O; dadurch können erheblich größere Mengen Energie der Syntheseleistung zugeführt werden. Allerdings befinden sich zwischen den Stoffwechselwegen im Cytosol und denen innerhalb des Mitochondriums zwei Membranen, die innere und die äußere Mitochondrienmembran. Die äußere Mitochondrienmembran ist für alle Moleküle unterhalb eines Molekulargewichtes von 5000 frei permeabel. Die innere Membran ist für H_2O, Ammoniak, O_2, CO_2, Harnstoff etc. durchlässig, für lipophile Moleküle eingeschränkt durchlässig, für größere polare Moleküle wie Aminosäuren, Dicarbonsäuren oder Kationen

impermeabel. Ein Membrandurchtritt erfolgt bei dieser Gruppe nur mit Hilfe spezieller Transportmoleküle, sogenannter Carrier oder Translokatoren. Durch räumliche Aufteilung der Zelle ist es möglich, Metabolite in den einzelnen Kompartimenten zu akkumulieren und Konzentrationsgradienten aufrechtzuerhalten. Die dazu notwendige Energie entstammt der Atmungskette. Die Atmungskette selbst speichert Energie in der Synthese von ATP und in einem Protonengradienten, bzw. Membranpotential über die innere Mitochondrienmembran (Mitchell, 1963, Klingenberg,1975). Dabei ist die in ATP gespeicherte chemische Energie in die elektrische Energieform umwandelbar (Klingenberg, 1975).

Auch für die Adeninnukleotide ist die innere Mitochondrienmembran impermeabel. Für ATP und ADP steht ein speziefischer Carrier zur Verfügung (Klingenberg & Pfaff, 1966, Vignais & Duee, 1966). Er tauscht ein ATP- oder ADP-Molekül gegen ein anderes ATP- oder ADP- Molekül über die innere Mitochondrienmembran aus, sodaß sich die Gesamtsumme der Adeninnukleotide im Mitochondrium nicht verändert.

Trotz vieler detaillierter Kenntnisse über die Eigenschaften der Atmungskettenproteine und den Adeninnukleotidtranslokator ist der Mechanismus der Atmungskontrolle noch nicht klar. Dieses liegt nicht zuletzt

auch an den verschiedenen Modellen zur Erforschung und Messung von Metabolitbewegungen über die innere Mitochondrienmembran wie isolierte Mitochondrien, isolierte Zellen oder isoliert perfundierte Organe; sie liefern zum Teil unterschiedliche Ergebnisse. So bestand z.B. das Problem, ob die verschiedenen mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten, die mit den beiden wichtigsten Methoden zur Untersuchung des mitochondrialen Raumes, die "Fraktionierung in nicht wässrigen Medien" von isoliert perfundierten Lebern (Elbers et al., 1974) und die Digitonin-Fraktionierung von isolierten Hepatocyten (Zuurendonk & Tager, 1974), bestimmt wurden, methodische Artefakte darstellten. Diese Frage konnte beantwortet werden, indem mitochondriale und cytosolische ATP/ADP-Quotienten in isolierten Hepatocyten mit Hilfe der Fraktionierung in nicht wässrigen Medien bestimmt wurden. Dabei zeigte sich, daß die an isolierten Hepatocyten gewonnenen mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten einen wirklichen Unterschied zur intakten Leber anzeigen und keinen methodischen Fehler als Ursache haben (Soboll et al., 1980). Weiterhin stellte sich nun die Frage, ob überhaupt beide Methoden an den isolierten Systemen Ergebnisse liefern, die sich auch in vivo finden lassen. Zweck dieser Arbeit war es daher, die subzellulären ATP/ADP-Gehalte an der Leber "in vivo"

zu bestimmen. Hierzu wurde eine schnelle Tötungsmethode, die "Zweiklingenbeilmethode" von Faupel (Faupel et al., 1972) bei Ratten zur Gewinnung der Rattenleber in vivo angewendet und das Lebergewebe in nicht wässrigen Medien aufgetrennt, wobei die Methode von Elbers (Elbers et al., 1974) modifiziert wurde.

2. M e t h o d e n

Für die Experimente wurden männliche Wistar-Ratten, 200 - 250 g schwer, verwendet. Die Tiere wurden mit Altromin Standartdiät gefüttert, bei Hungerexperimenten wurden sie 48 Stunden unter Nahrungsentzug gehalten.

2.1. Gewinnung des Lebergewebes "in vivo":

2.1.1. mit Narkose

Die Ratten wurden entweder mit Nembutal (Natrium-pentobarbital, Abbott, 50 mg/kg) oder Ketanest (Ketaminhydrochlorid, Parke Davis, 120 mg/kg) durch intraperitoneale Injektion betäubt. Nach Eröffnen des Abdomens durch einen Medianschnitt wurde der in Seitlage liegenden Ratte mit einer speziellen Zange (stumpf, über die Kante gebogen, 25 cm lang) ein gut erreichbarer Teil der Leber schnellstmöglich entfernt und mit Hilfe einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Zange nach Wollenberger (Wollenberger et al., 1960) modifiziert nach Elbers (Elbers et al., 1974) friergestoppt. Dauer des Stoppvorganges: ca 1 s .

2.1.2. ohne Narkose

Hier wurde nach einer von Faupel (Faupel et al., 1972) beschriebenen Methode die Ratte mit einem Zweiklingenbeil in 3 Teile zerhackt und die Leber sofort nach Wollenberger friergestoppt. Dauer des Stoppvorganges: ca 2 - 3 s .

2.2. Fraktionierung in organischen Lösungsmitteln, (Elbers et al., 1974) modifiziert für die Leber in vivo

Das gefrorene Lebergewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und danach 3 - 4 Tage lyophilisiert, anschließend bei - 60° C aufbewahrt. Etwa 300 mg des getrockneten Leberpulvers wurden in 11 ml einer Mischung aus Heptan und CCl_4, Dichte 1.29 g/ml, suspendiert. Das Gemisch wurde mit einem Beschallungsgerät (Branson - Sonifier, 150 Watt) 4 Minuten in 5s Intervallen beschallt und kontinuierlich gekühlt. Die Kühlung wurde mit Heptan und Trockeneis durchgeführt, um eine Überhitzung der Probe und Wassereintritt in das Lebergewebe zu vermeiden.
Zur Abtrennung des Bindegewebes wurde das Homogenat auf eine Säule aufgetragen, die mit Glasperlen

(0.25 - 0.3 mm Ø, Fa. Braun-Melsungen) und einem Heptan- CCl_4 - Gemisch der Dichte 1.29 g/ml gefüllt war. Das Homogenat wurde in einem Sorvall- Zentrifugenglas aufgefangen und bei 10,500 x g 10 s zentrifugiert. Der erythrocytenhaltige Überstand wurde verworfen, das Sediment in 2.4 ml eines Heptan - CCl_4 - Gemisches der Dichte 1.29 g/ml wieder aufgenommen. In dieser Suspension hat außer der Abtrennung der Erythrocyten (Dichte kleiner als 1.29 g/ml, daher im Überstand) noch keine weitere Fraktionierung stattgefunden (→ Diskussion).

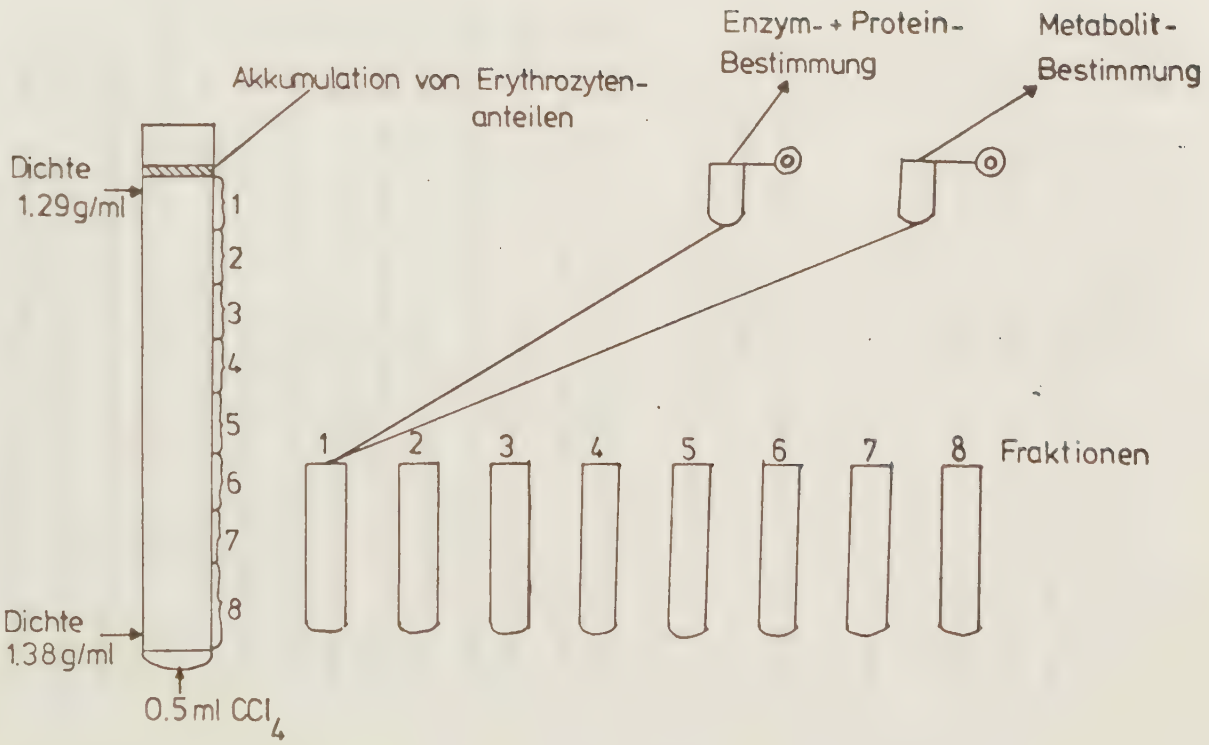
Von dem resuspendierten Homogenat wurden je 0.2 ml für Enzymaktivitätsmessungen und 0.2 ml für Metabolitbestimmungen abgenommen. Der Rest wurde auf einen exponentiellen Dichtegradienten aus Heptan- CCl_4 - Lösungsmittelgemischen, deren Dichten von 1.29 - 1.38 g/ml reichten, aufgetragen und 4 Stunden bei 16,000 x g zentrifugiert.

Sämtliche Arbeiten während der Fraktionierung wurden bei 4^{o} C ausgeführt.

Während der 4 Stunden Zentrifugationszeit hatte sich eine zusätzliche Absonderung von Erythrocyten-Bestandteilen (Dichte ca 1.29 g/ml, siehe auch Abb. 1) eingestellt. Aus dem Dichtegradienten wurden 6 - 8 Fraktionen gewonnen, die jeweils in

Abbildung 1:

Fraktionen des Dichtegradienten



2 Aliquots, eines für Bestimmung der Leitenzyme und eines für Metabolitanalysen, aufgetrennt wurden (Abb. 1). Die Aliquots aus den Fraktionen und vom unfraktionierten Homogenat wurden nach Zugabe von ca 0,5 ml Heptan zentrifugiert und das Sediment im Exsiccator bei Zimmertemperatur getrocknet. In allen Fraktionen und im Homogenat wurden die Aktivitäten der Leitenzyme und die Gehalte der Adeninnukleotide bestimmt.

Die Metabolitgehalte im mitochondrialen und cytosolischen Kompartiment wurden nach Gleichung (1) (Elbers et al., 1974)

$$\frac{\text{Metabolit total}}{\text{Citratsynthase-Aktivität}} = a \times \frac{\text{3-Phosphoglycerat-kinase-Aktivität}}{\text{Citratsynthase-Aktivität}} + b \qquad (1)$$

errechnet.

Herleitung der Gleichung (1) :

Citratsynthase bzw. 3- Phosphoglyceratkinase werden als Leitenzyme für den mitochondrialen Raum bzw. den cytosolischen Raum verwendet. Beim Beschallungsvorgang entstehen Lebergewebepartikel unterschiedlicher Dichte, bei denen die spezifischen Leitenzyme für das jeweilige Kompartiment (Citratsynthase = mitochondrialer Raum, 3-Phosphoglyceratkinase = cytosolischer Raum) und die Metabolite eines jeden

Kompartimentes aneinanderhängen. Daraus folgt, daß in jeder Fraktion ein bestimmtes

$$\frac{\text{Metabolit cytosolisch}}{\text{3-Phosphoglyceratkinase-Aktivität}} \quad - \quad \text{und}$$

$$\frac{\text{Metabolit mitochondrial}}{\text{Citratsynthase - Aktivität}} \quad - \quad \text{Verhältnis besteht :}$$

$$\frac{\text{Metabolit cytosolisch}}{\text{3-Phosphoglyceratkinase-Aktivität}} \quad = \quad a \qquad (2)$$

$$\frac{\text{Metabolit mitochondrial}}{\text{Citratsynthase - Aktivität}} \quad = \quad b \qquad (3)$$

Gleichung (1) stellt die Form einer Geradengleichung ($y = ax + b$) dar und erlaubt mit Hilfe der linearen Regression die Ermittlung der Faktoren a und b, und damit (nach Einsetzen in (2) bzw. (3)) die direkte Bestimmung der mitochondrialen und cytosolischen Metabolitgehalte. Diese Metabolitgehalte können dann in Konzentrationen umgerechnet werden, wenn der Wassergehalt bekannt ist. Die verwendeten Werte sind : Wassergehalt Mitochondrien 0.8 µl/mg Protein, Wassergehalt Cytosol 3.8 µl/mg Protein (Werte angegeben von Soboll et al., 1976).

2.3. Isoliert perfundierte Rattenleber

Nach Narkotisierung der Ratte (Nembutal 50 mg/kg) wurde das Abdomen eröffnet, die Vena porta und die Vena cava inferior kanüliert, die Leber aus dem Organismus herausoperiert und nach den von Scholz angegebenen Richtlinien perfundiert, (Scholz et al., 1973).

2.4. Testverfahren

Die Messung der Leitenzyme, des Proteingehalts und der Metabolite erfolgte nach den von Soboll angegebenen Verfahren (Soboll et al., 1978). Die Metabolitbestimmungen wurden an einem Sigma ZWS-11 Zweiwellenlängen-Spektrophotometer der Firma Biochem, München, bei 340 - 400 nm durchgeführt.

2.5. Material

Enzyme und Coenzyme wurden von der Firma Boehringer, Mannheim, Nembutal von Abbott, Neuilly-sur-Seine, Frankreich, und Ketanest von Parke-Davis, München, bezogen.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Fraktionierung in nicht wässrigen Medien- die subzelluläre Verteilung der Metabolite ATP, ADP

3.1.1. Gefütterte Tiere, keine Narkose

Tabelle 1 zeigt die Gesamtgehalte und die subzellulären Konzentrationen von ATP und ADP in der Rattenleber unter "in vivo" Bedingungen. Weiterhin sind die ATP/ADP - Quotienten des unfraktionierten Gewebes sowie die subzellulären ATP/ADP - Quotienten angegeben. Dabei zeigt sich, daß auch bei der Leber "in vivo" im Cytosol ein 6 - 12 fach höherer ATP/ADP - Quotient als im Mitochondrium besteht. Ähnliche Relationen wurden in der isoliert perfundierten Leber bzw. isolierten Mitochondrien gefunden (Soboll et al., 1978, Heldt et al., 1972). Der "Über alles" - ATP/ADP - Quotient liegt im Bereich, der von Faupel mit der "Zwei-Klingen-Beil"- Methode angegeben wurde (Faupel et al., 1972).

Tabelle 2 zeigt den Vergleich der "in vivo" bestimmten ATP/ADP - Quotienten mit den ATP/ADP - Quotienten in den isolierten Systemen. Es läßt sich entnehmen, daß die "in vivo" mit der Frak-

Tabelle 1 : Subzelluläre ATP- und ADP- Gehalte bzw. ATP/ADP - Quotienten der Leber "in vivo" ohne Narkose, (Mittelwerte aus 4-5 Lebern ± SEM)

	gefüttert	gehungert	wiedergefüttert
Gesamtgehalt:		(µmol / g Trockengewicht)	
ATP	11.67±0.88	9.57±0.50	9.44±0.29
ADP	3.01±0.22	2.89±0.17	2.64±0.1
AMP	0.58±0.10	0.67±0.11	----
ATP/ADP	3.89±0.16	3.32±0.13	3.59±0.14
Mitochondrium:		(µmol/ml mitochondriales Wasser)	
ATP	6.63±1.03	7,53±0.82	4.53±1.20
ADP	8.38±1.55	7.29±0.73	7.05±0.17
ATP/ADP	0.88±0.14	1.03±0.02	0.63±0.15
Cytosol:		(µmol/ml cytosolisches Wasser)	
ATP	5.81±0.60	5.09±0.31	5.02±0.31
ADP	0.81±0.19	0.87±0.09	0.71±0.08
ATP/ADP	6.96±0.46	6.07±0.53	7.20±0.54

Tabelle 2: Mitochondriale und cytosolische ATP/ADP - Quotienten in der Leber "in vivo" (ohne Narkose), isoliert perfundierter Leber und isolierten Hepatocyten

	gefüttert	gehungert	wiedergefüttert
Leber "in vivo"			
ATP/ADP mitochondrial	0.9	1.0	0.6
ATP/ADP cytosolisch	7.0	5.9	7.2
Isoliert perfundierte Leber			
ATP/ADP mitochondrial	0.2	0.7 Soboll et al., 1978	
ATP/ADP cytosolisch	10.3	2.6 "	
Isolierte Hepatocyten			
ATP/ADP mitochondrial	2.3	1.5 Akerboom et al., 1978; Soboll et al., 1980	
ATP/ADP cytosolisch	5 - 12	9.1 Siess & Wieland, 1976; Akerboom et al., 1978; Soboll et al., 1980	

tionierungsmethode in nicht wässrigen Medien gemessenen mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten zwischen den beiden Extremen, der isoliert perfundierten Leber, mitochondrialer ATP/ADP - Quotient 0.2 (Soboll et al., 1978), und den isolierten Hepatocyten, mitochondrialer ATP/ADP - Quotient 2.3 (Soboll et al., 1980), liegen. Bei den cytosolischen ATP/ADP - Quotienten lassen sich zwischen den einzelnen experimentellen Systemen keine wesentlichen Unterschiede finden.

3.1.2. Gehungerte Tiere, keine Narkose

Tabelle 2 verdeutlicht, daß im Hungerzustand bei "in vivo"- Experimenten der mitochondriale ATP/ADP - Quotient ansteigt, während der cytosolische abfällt. Die Änderungen sind jedoch gering.
Ein ähnlicher Befund wurde auch an der isoliert perfundierten Leber gemessen (Soboll et al., 1978). Die Veränderungen sind in der isoliert perfundierten Leber allerdings größer, der mitochondriale ATP/ADP - Quotient steigt von 0.2 auf 0.7 an, während der cytosolische Quotient von 10.3 auf 2.6 im Hunger abfällt (Soboll et al., 1978).

3.1.3. Wiedergefütterte Tiere, keine Narkose

Es wurden Ratten untersucht, denen nach einer 48-stündigen Hungerperiode für 60 min wieder Nahrung ad libitum angeboten wurde. Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 zeigen, daß die subzellulären Gehalte wie auch der Gesamtgehalt an ATP und ADP keinen signifikanten Unterschied gegenüber den Tieren aufweisen, die bis zur Gewinnung des Lebergewebes 48 Stunden keine Nahrung bekamen. Der mitochondriale ATP/ADP - Quotient ist niedriger als bei gefütterten Tieren und der cytosolische Quotient höher, sodaß bei wiedergefütterten Tieren die Änderung der subzellulären ATP/ADP - Quotienten gegenüber den Quotienten bei 48 h hungernden Tieren signifikant ist.

3.1.4. Narkotisierte Tiere

Die subzellulären ATP/ADP - Quotienten wurden auch bei narkotisierten Tieren bestimmt. Dabei zeigte sich bei der Narkose mit Nembutal ein Absinken des mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten (Tabelle 3). Auch der cytosolische ATP/ADP - Quotient wies eine Erniedrigung auf.

Tabelle 3: Subzelluläre ATP- und ADP- Gehalte und ATP/ADP - Quotienten der Leber "in vivo" mit Narkose, gefütterte Tiere (Mittelwerte aus 4 Lebern ± SEM)

	Narkose mit:	
Gesamtgehalt:	Pentobarbital	Ketanest
	(µmol/ g Trockengewicht)	
ATP	9.88±0.28	11.3±0.56
ADP	3.14±0.11	2.67±0.25
ATP/ADP	3.06±0.22	4.30±0.39
Mitochondrium:	(µmol/ml mitochondriales Wasser)	
ATP	4.21±0.82	6.42±0.60
ADP	7.43±0.73	7.55±0.97
ATP/ADP	0.55±0.06	0.86±0.04
Cytosol:	(µmol/ml cytosolisches Wasser)	
ATP	5.62±0.36	5.91±0.41
ADP	0.99±0.12	0.69±0.19
ATP/ADP	5.83±0.40	10.3±2.10

Die Anästhesie mit Ketanest hingegen scheint keinen vergleichbaren Einfluß auf den mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten zu haben. Der angegebene ATP/ADP- Quotient entspricht dem "in vivo" gemessenen Quotienten. Im Cytosol wurden bei Narkose mit Ketanest die höchsten ATP/ADP - Quotienten gemessen.
Interessanterweise steigt im Hungerzustand bei narkotisierten Tieren der mitochondriale ATP/ADP - Quotient ebenfalls an, bei mit Ketanest narkotisierten Tieren um ca 10 %, bei Nembutal als Injektionslösung um fast das Doppelte.

3.2. Wirkung von Ketanest und Nembutal in der isoliert perfundierten Rattenleber

Die Wirkung des Narkotikums Ketanest (Ketaminhydrochlorid) wurde auch an isolierter Rattenleber untersucht; es wurden Konzentrationen infundiert, die im Lebergewebe "in vivo" während der Narkose auftreten können. Dabei wurde die Injektionsmenge (ca 120 mg/kg) auf den gesamten Wassergehalt des Tieres (ca 2/3 des Tiergewichtes, Skelton, 1937) bezogen. Dieses entspricht einer Ketanest-Konzentration von ca 0.7 mM. Bei dieser

Berechnung wird angenommen, daß sämtliches Narkosemittel sofort in dem Gesamtwasser gelöst ist und keine Einlagerung in Fettgewebe bzw. unverzüglicher Abbau stattfindet, der Wert könnte daher eher zu hoch sein. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß man mit dem "Gesamtwasserwert" die tatsächliche Endkonzentration des Narkotikums im Pfortaderblut unterschätzt. Deshalb wurden dem Perfusat auch höhere Konzentrationen des Narkotikums zugegeben.

Zum Vergleich wurde Nembutal infundiert. Bei Bezug der Nembutalinjektionsmenge (ca 50 mg/kg) auf den gesamten Wassergehalt des Tieres erhält man einen Konzentrationswert von 0.3 mM, der während einer isolierten Perfusion eingestellt wurde.

Die Perfusionsergebnisse zeigen, daß bei einer Ketanest- Konzentration von 1.4 mM im Perfusat noch keine Änderung des ß- Hydroxybutyrat/Acetoacetat - Quotienten, ebenso keine Änderung der einzelnen Metabolite ß-Hydroxybutyrat, Acetoacetat und auch keine Veränderung der Sauerstoffaufnahme, auftritt (Abb. 2). Deutliche Effekte sind erst bei einer Ketanest-Perfusatkonzentration von 2.8 mM zu beobachten. Es zeigt sich ein Anstieg der

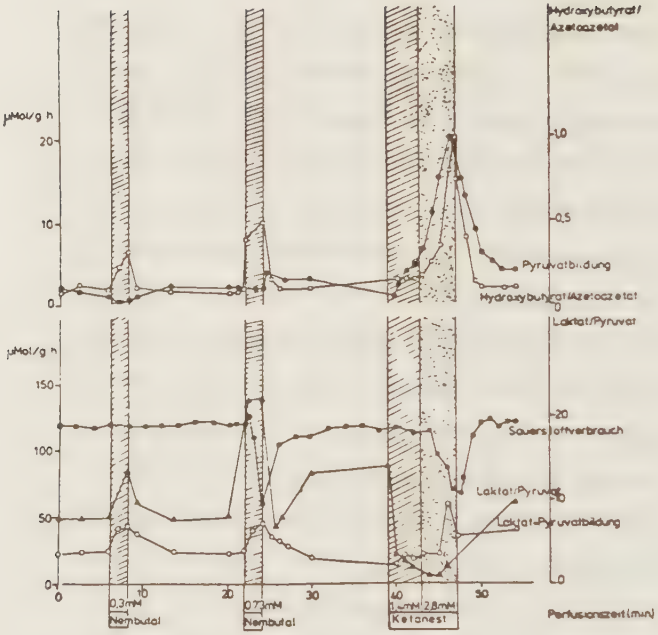


Abbildung 2 :

Geschwindigkeit der Glykolyse und der Sauerstoff-aufnahme, sowie Redoxquotienten (Laktat/Pyruvat für das cytosolische NAD- System, ß-Hydroxybutyrat/ Acetoacetat für das mitochondriale NAD- System) in perfundierter Leber bei verschiedenen Narkotika-Konzentrationen.

Pyruvat-Konzentration, dadurch bedingt - Laktat bleibt konstant-, ein Abfall des Laktat/Pyruvat-Quotienten. Der mitochondriale Redoxquotient, ß-Hydroxybutyrat/Acetoacetat, ist bei dieser Konzentration erhöht. Nembutal hat bei einer Perfusatkonzentration von 0.3 mM Veränderungen der Redoxquotienten zur Folge, sowohl der Laktat/Pyruvat - als auch der ß-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotient steigen um ca das Doppelte an. Bei höheren Konzentrationen wird auch die Sauerstoffaufnahme der isoliert perfundierten Leber vermindert, bei der in Abb. 2 gezeigten Konzentration um ca 50 % .

4. D i s k u s s i o n

4.1. Methodik

Bisher existierte noch kein Verfahren, welches eine direkte Messung von Metabolitgehalten im mitochondrialen Kompartiment einer Leber unter "in vivo"- Bedingungen erlaubte. "In vivo"- Bedingung heißt dabei Frierstopp des Lebergewebes direkt aus dem Organismus heraus innerhalb von 1 - 3 s nach den unter 2. beschriebenen Verfahren. In dieser Zeit verändern sich die empfindlichsten Parameter bezüglich O_2- Mangel wie ATP, ADP, AMP, cyclo- AMP etc. nicht (Seitz et al., 1977). Dabei ist sich der Autor bewußt, daß der jeweilige metabolische Stopp durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff nur eine "Momentaufnahme" darstellt, während neue Techniken, zum Beispiel die Kernresonanzspektroskopie, in der Zukunft "Filme" der metabolischen Vorgänge zeigen könnten. Allerdings sind neben der Kompartimentierung die Probleme der Narkose und des Stresses zusätzlich zu lösen. Im Moment ist es nicht möglich, Metabolitgehalte unter "in vivo"- Bedingungen im mitochondrialen Kompartiment mit anderen als der beschriebenen Methode zu bestimmen.

Bisher scheiterte die Anwendung der von Elbers beschriebenen Fraktionierungsmethode in nicht wässrigen Medien auf die Leber "in vivo" an den Erythrocyten. Durch das Hinzukommen eines dritten Kompartimentes wird das rechnerische Extrapolationsverfahren kompliziert und eine genaue Berechnung mitochondrialer und cytosolischer Metabolitgehalte praktisch unmöglich. Diese Schwierigkeit konnte durch physikalische Abtrennung der Erythrocyten umgangen werden.

Die Trennung der hämoglobinhaltigen Bestandteile erfolgt aufgrund der niedrigeren Dichte der Erythrocyten gegenüber dem Lebergewebe. Nach dem Reinigungsschritt enthält das Lebergewebe noch 82 nmol Hämoglobin/g trocken, während das Lebergewebe einer hämoglobinfrei perfundierten Leber etwa 70 nmol Hämoglobin/g trocken enthält. Im Überstand treten entsprechend höhere Hämoglobingehalte auf (bis 550 nmol/g trocken, siehe auch Tabelle 4). Wichtig ist, daß im Dichtebereich von 1.29 g/ml außer der Abtrennung des erythrocytenhaltigen Materials keine Auftrennung oder Absonderung der mitochondrialen oder cytosolischen Bestandteile stattgefunden hat. Dieses ist nicht zu erwarten, da Lebergewebe eine Dichte von 1.29 - 1.38 g/ml hat.

Tabelle 4 : Hämoglobingehalt in der isoliert perfundierten Leber und der Leber "in vivo"

Der Hämoglobingehalt wurde nach van Kampen & Zijlstra (1961) bestimmt.

	nmol Hb / g Trocken-gewicht
Hämoglobinfrei perfundierte Leber	70
Leber "in vivo"	432
Sediment nach Abtrennung der Erythrocyten (siehe 2.2.)	82
Überstand (siehe 2.2.)	350
1. Erythrocytenreiche Fraktion (Abb. 1)	134

Im Überstand des von Erytrocyten gereinigten Lebergewebes ist der Quotient der Aktivität der Leitenzyme Citratsynthase und 3-Phosphoglyceratkinase kleiner als im Homogenat (Tabelle 5).

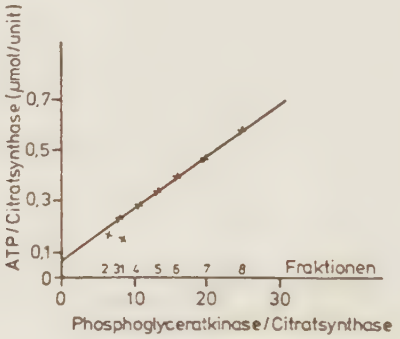
Tabelle 5 : Enzymaktivitätsquotienten in Überstand und Sediment nach Abtrennung des größten Teiles der Erythrocyten

	Überstand	Sediment
Citratsynthase/ 3-Phosphoglyceratkinase	4.5×10^{-3}	5.7×10^{-3}

Dies ist darauf zurückzuführen, daß in den Erythrocyten keine Citratsynthaseaktivität gefunden wird (eigene Untersuchungen). Diese Tatsache ermöglicht später beim Auswerten der Meßergebnisse ein genaues Erfassen der eventuell noch vorhandenen Verunreinigungen. Das ist wichtig bei der Analyse von Lebern gehungerter Tiere, die wahrscheinlich auf Grund des verminderten Glykogengehaltes eine geringere Dichte haben als Lebern gefütterter Tiere. Fraktionen, die noch Erythrocytenbestandteile enthalten, fallen im Koordinatensystem bei der Auftragung

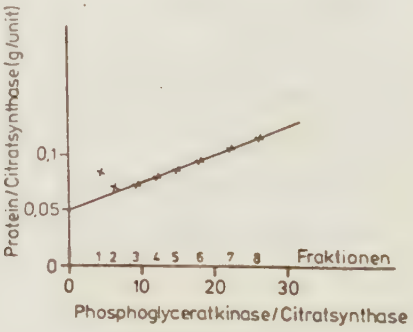
3-Phosphoglyceratkinase/Citratsynthase durch eine charakteristische "Rechtsverschiebung" auf (wegen der fehlenden Citratsynthaseaktivität in den Erythrocyten).

Abbildung 3 :



In der Proteinmessung zeigt sich dagegen eine Verschiebung zu erhöhten Proteinwerten, da der Farbstoff Hämoglobin die Messung verfälscht. Die Fraktionen (in Abbildung 3 und Abbildung 4 jeweils die Fraktionen 1 und 2), welche diese Verschiebungen zeigen, werden bei der Ermittlung der Regressionsgerade nicht berücksichtigt.

Abbildung 4 :



4.2. Einfluß der Narkose mit Nembutal bzw. Ketanest auf isolierte Mitochondrien, isoliert perfundierte Leber und die Leber "in vivo"

4.2.1. Einfluß der Narkose auf isolierte Mitochondrien und isoliert perfundierte Leber

An isolierten Mitochondrien konnte schon früher gezeigt werden, daß Nembutal die Atmungsketten-aktivität hemmt (Chance & Hollunger, 1963; Ernster et al., 1963). Am Gesamtlebergewebe konnte bereits 1966 gezeigt werden, daß eine Reduktion des Gesamt ATP/ADP - Quotienten als Folge von Narkotika- Zugabe auftritt (Reinauer & Hollmann, 1966). Für perfundierte Leber wird beschrieben, daß die Sauerstoffutilisation reduziert ist und die Redoxquotienten sowohl im Cytosol (Laktat/ Pyruvat) als auch in den Mitochondrien (ß-Hydroxy-butyrat/Acetoacetat) erhöht sind (Scholz et al., 1966) . Nembutal scheint also als Narkotikum bei "in vivo" Untersuchungen der subzellulären Adenin-nukleotidverteilung nicht geeignet zu sein.
Ob die Voraussetzungen für das Anästhetikum Ketanest (Ketaminhydrochlorid ist ein in der

Human- und Veterinärmedizin verwendetes Narkotikum) günstiger sind oder ob sich während der Narkose mit Ketanest ähnliche Veränderungen wie bei Nembutal zeigen, wurde zunächst an den isolierten Systemen untersucht.

An isolierten Mitochondrien wurde die 50-fache Ketanest-Konzentration benötigt, um dem Nembutal vergleichbare Inhibitionseffekte beim O_2 - Verbrauch zu erreichen (Soboll, persönliche Mitteilung, Abbildung 5).

An der isoliert perfundierten Leber zeigten sich erst Veränderungen (Hemmung der O_2- Aufnahme, Verschiebung von Redoxquotienten) bei vielfach höheren Konzentrationen von Ketanest als bei Nembutal (Abb. 2).

Insgesamt lassen die Ergebnisse aus den Untersuchungen an isolierten Mitochondrien und perfundierter Leber vermuten, daß in vivo eine Beeinflussung der mitochondrialen Atmung bei einer Narkose mit Ketanest nicht auftritt.

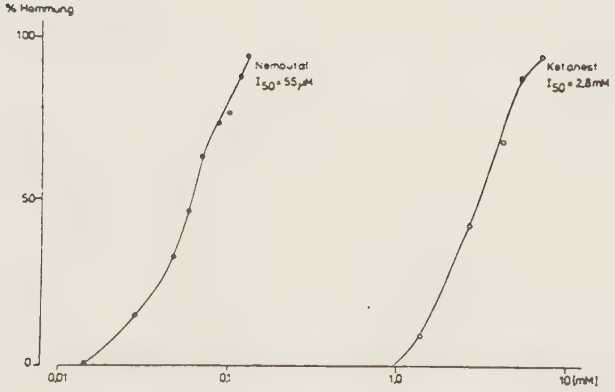


Abbildung 5 :

Hemmung der mitochondrialen Atmung durch Nembutal bzw. Ketanest; Rattenlebermitochondrien (1 mg/ml) wurden in einer luftdicht verschließbaren Kammer von 1.4 ml Innenraum bei Zimmertemperatur inkubiert und der Sauerstoffverbrauch gemessen. Das Inkubationsmedium enthielt 0.25 M Saccharose, 0.01 M Triäthanolamin, 2.5 mM KH_2PO_4, 7.2 mM Glutamat, 5.8 mM Malat, 1.5 mM ADP.

I_{50} = Konzentration an Narkotikum, die zur halbmaximalen Hemmung der Atmung benötigt wird

4.2.2. Einfluß der Narkose auf die subzelluläre Verteilung von ATP, ADP der Leber "in vivo"

Die mitochondrialen und cytosolischen ATP/ADP - Quotienten in Rattenlebern bei Nembutalnarkose zeigten eine deutliche Erniedrigung gegenüber Quotienten in Lebern von nicht betäubten Tieren. Dem könnte eine Hemmung der Atmungskette durch Nembutal "in vivo" zu Grunde liegen. Dagegen konnte gezeigt werden, daß die mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten während der Ketanest-Anästhesie sich im Bereich der ohne Anästhesie gemessenen vergleichbaren Daten bewegen. Daraus kann man schließen, daß Ketanest in Konzentrationen, die zur Narkose verwendet werden, keinen Einfluß auf die mitochondriale Atmung hat; dieser Befund bestätigt die Untersuchungen an isolierten Mitochondrien und perfundierter Leber.

4.3. Subzelluläre Verteilung der Metabolite ATP, ADP in der Leber "in vivo" ohne Narkose

Interessant ist der Vergleich der "in vivo" gemessenen ATP/ADP - Quotienten mit denen der isoliert perfundierten Leber, bzw. isolierten Hepatocyten. Hier zeigt sich, daß bei isolierten Hepatocyten im Mitochondrium höhere ATP/ADP - Quotienten als in Mitochondrien "in vivo" anzutreffen sind, während die vergleichbaren ATP/ADP - Quotienten in der isoliert perfundierten Leber am niedrigsten bestimmt wurden (Akerboom et al., 1978; Soboll et al., 1980). Um eine Erklärung für diese Diskrepanz zu finden, bedarf es erstens der Überlegung, welche Voraussetzungen in den drei Versuchsmodellen unterschiedlich sein könnten, und zweitens, welche mögliche Reaktionskette als Folge dieser verschiedenen Voraussetzungen die voneinander abweichenden Ergebnisse verursacht.

4.3.1. Sauerstoffversorgung der isoliert perfundierten Leber, der isolierten Hepatocyten und der Leber "in vivo"

In den drei Versuchsmodellen ist das Sauerstoff-

angebot an die einzelne Leberzelle unterschiedlich. Im Blut hat die Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin ein Sauerstoffangebot zur Folge, das um ein Vielfaches oberhalb der maximal im Perfusat der isoliert perfundierten Leber auftretenden O_2- Konzentration liegt (ca 8 mM in Erythrocyten, Severinghaus, 1965; ca 0.8 mM in Krebs-Henseleit-Puffer, Scholz & Bücher, 1965).

Das System der isolierten Hepatocyten unterscheidet sich gegenüber der isoliert perfundierten Leber dadurch, daß bei ihm trotz gleicher O_2 - Konzentration im Medium alle Zellen direkt der O_2 - Konzentration im Medium ausgesetzt sind und Konzentrationsgradienten, wie sie innerhalb des Organs auftreten, wegfallen. Daß zwischen dem niedrigen mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten in der isoliert perfundierten Leber und dem Sauerstoffangebot ein Zusammenhang besteht, dafür sprechen Versuche, bei denen isolierte Rattenlebern mit H_2O_2 (0.8 mM) perfundiert wurden. H_2O_2 läßt intrazellulär das Sauerstoffangebot ansteigen, indem es via Katalase die Sauerstoffkonzentration in der Zelle erhöht; die Katalasereaktion verläuft nach der Gleichung $2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$. Diese Reaktion stellt normalerweise eine Schutzreaktion der Zelle gegen-

über einer Anhäufung von H_2O_2 dar. In diesem Versuchsmodell hat sie den Vorteil, daß sich die Sauerstoffversorgung durch Diffusion des Sauerstoffs selbst und die Sauerstoffversorgung durch intrazellulären H_2O_2 - Abbau addieren. Interessanterweise läßt sich dadurch der mitochondriale ATP/ADP - Quotient auf Werte um 1 steigern (Soboll et al., 1982, in Vorbereitung).

Für eine ausreichende O_2 - Versorgung der isoliert perfundierten Leber spricht der erheblich höhere Perfusatfluß im Vergleich zur Leber in vivo (Faktor 5 - 10). Außerdem stellt sich der O_2- Verbrauch auf einen konstanten Wert ein, das heißt, es wird über einen längeren Zeitraum die gleiche Menge O_2 von der Leber aus dem Perfusat entnommen. Dieser O_2 - Verbrauch steigt nun bei verschiedenen Energie verbrauchenden Prozessen wie Harnstoffsynthese, Drogenoxydation etc., an; bei einer Unterversorgung wäre ein konstanter Verbrauch zu erwarten. Weiterhin spricht für eine ausreichende O_2 - Versorgung der isoliert perfundierten Leber, daß sich nur ein Reduktionsgrad der Cytochrom-Oxidase von 2 ± 1 % finden läßt (Sies, 1977). Dies schließt jedoch die Existenz von O_2 - Gradienten innerhalb der Leberzelle oder der Leber nicht aus (Sies, 1977). Die spektrophoto-

metrischen Messungen erfassen den Querschnitt durch einen Leberlappen ohne Unterscheidung der periportal und perizentral gelegenen Leberbereiche. In einer anderen Untersuchung werden entsprechende Unterschiede im Reduktionsgrad der Cytochrom-Oxidase unter "in vivo" - ähnlichen Bedingungen beschrieben (Matschinsky et al., 1978). Es wurde gefrorenes Lebergewebe durch Fluoreszenz Scanning untersucht und gezeigt, daß in der Leber Bereiche mit unterschiedlichem Reduktionsgrad der Pyridinnukleotide vorhanden sind. Die Autoren vermuten, daß die mehr oxidierten Zonen im Bereich der Portalfelder und die mehr reduzierten Zonen im Bereich der Acini zu finden sind, also möglicherweise parallel eines Sauerstoffgradienten. Damit übereinstimmende Befunde beschreibt Ji (Ji et al., 1980). Es wurden mit einem Mikro - Lichtleiter von 170 µm Durchmesser aufgrund des Reduktionsgrades der Cytochrom-Oxidase und des NAD(P)H-Systemes periportal (mehr oxidiert) und perizentral (mehr reduziert) gelegene Leberbereiche unterschieden.

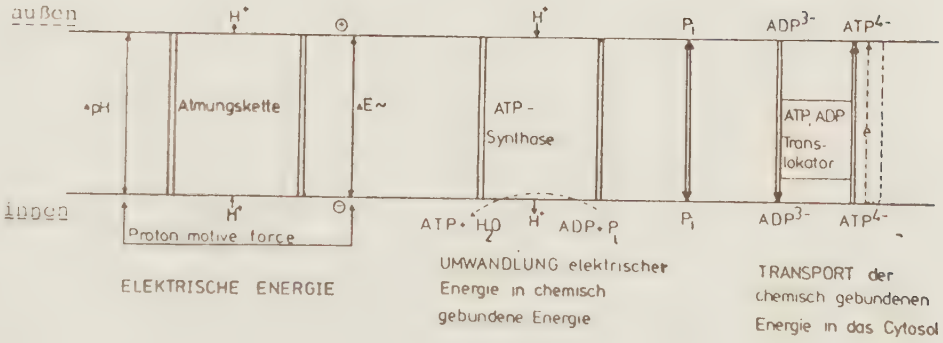
Die isolierten Hepatocyten sind einer hohen Sauerstoffkonzentration im Vergleich zu "in vivo" - Bedingungen ausgesetzt (Hyperoxygenation). Tatsächlich ist jede isolierte Leberzelle derselben

Sauerstoffkonzentration ausgesetzt, wie der Anfangsbereich einer Perfusionsstrecke, also ca 800 µM O_2 .

Die Beziehung zwischen Sauerstoffangebot und mitochondrialem ATP/ADP - Quotienten ist über die Atmungskettenaktivität zu erklären. Die Atmungskettenaktivität ist bei einem reduzierten Sauerstoffangebot vermindert (Sies, 1977). Durch das Abnehmen der Atmungskettenaktivität sinkt auch die "Proton motive force", die Summe aus Membranpotential und der pH - Differenz (Abb. 6) über der inneren Mitochondrienmembran (Mitchell,1963). Diesem Absinken der "Proton motive force" wird versucht entgegenzuwirken, indem mitochondriales ATP hydrolysiert wird und die freiwerdende Energie in den ΔpH bzw. das Membranpotential übertragen wird (Klingenberg, 1975). Der mitochondriale ATP/ADP - Quotient könnte dann als Folge einer neuen Gleichgewichtseinstellung sinken.

Abbildung 6 :

-Elektrochemische Kopplung zwischen Atmungskette und ATP - Synthase
- ATP/ADP - Translokator



4.3.2. Beziehung zwischen der Aktivität des Adeninnukleotidtranslokators und dem mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten

Nicht nur die Aktivität der Atmungskette, sondern auch der ATP-ADP - Translokator übt einen Einfluß auf den mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten aus (Abb.6). Wie Versuche mit Carboxy-Atractylosid an der isoliert perfundierten Leber zeigen, staut sich bei Zugabe dieses Translokatorhemmers ATP in den Mitochondrien an und der mitochondriale ATP/ADP - Quotient steigt an (Soboll et al.,1978). An isolierten Mitochondrien wurde gezeigt, daß auch langkettige, CoA-aktivierte Fettsäuren den ATP-ADP - Transport hemmen (Wojtczak et al., 1967; Pande et al., 1971; Shug et al., 1971; Lerner et al., 1972; Vaartjes et al., 1972; Harris et al., 1972; Morel et al., 1974). An der isoliert perfundierten Leber bzw. der Leber "in vivo" gibt es ebenfalls Anzeichen, daß der Translokator durch langkettige Fettsäure CoA- Ester beeinflußt wird. Im Hungerzustand sind die langkettigen Acyl-CoA - Spiegel in der Zelle von 25 nmol/g wwt im Futterzustand auf ca 90 nmol/g wwt im Hungerzustand erhöht (Seitz et al., 1977).

Es wurde sowohl in der isoliert perfundierten

Leber als auch in der Leber "in vivo" ein Anstieg des mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten im Hungerzustand gefunden (Soboll et al., 1978, siehe Tabelle 2). Bislang galten als wichtigstes Argument gegen eine derartige Beeinflussung des mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten durch langkettige, CoA-aktivierte Fettsäuren Untersuchungen an isolierten Hepatocyten (Siess et al., 1976; Akerboom et al., 1978). Beide konnten an isolierten Hepatocyten keine signifikante Beeinflussung des mitochondrialen ATP/ADP - Quotienten nach Inkubation mit Oleat finden. Dies kann zwei Gründe haben; zum einen ist der Anstieg an Oleyl-CoA in den Untersuchungen von Akerboom nur 1.7 fach (von ca 70 auf 120 nmol/g wwt) im Vergleich zu dem fast 4 fachen Anstieg an langkettigen Acyl-CoA in der Leber in vivo, wobei der Ausgangswert schon relativ hoch ist (70 nmol Oleyl-CoA im Vergleich zu 20 nmol langkettige Acyl-CoA in der Leber in vivo). Zum anderen ist der mitochondriale ATP/ADP - Quotient vor Oleatzugabe ebenfalls sehr hoch (1.8 - 2.0), sodaß eventuell ein Anstieg nicht mehr beobachtet werden kann.
Weiterhin für einen Zusammenhang zwischen der Konzentration an langkettigen Fettsäure CoA-Estern und einer möglichen Hemmung des Adeninnukleotid-

transportes in der Leberzelle sprechen Ergebnisse von Versuchen an wiedergefütterten Ratten. Diesen wurde nach einer 48-stündigen Hungerperiode wieder für 60 min Nahrung zugeführt. Bei diesen Tieren ist die langkettige Fettsäure-CoA - Konzentration wieder auf den Wert im Futterzustand abgesunken (Seitz et al., 1977). Durch Fraktionierung in nicht wässrigen Medien konnte gezeigt werden, daß auch der Wert für den mitochondrialen ATP/ADP - Quotient in dem Bereich der Werte bei gefütterten Tieren liegt, also wieder abgesunken ist (Tabelle 2).

5. Zusammenfassung

Eine kürzlich entwickelte Fraktionierungsmethode in nicht wässrigen Medien wurde erstmals auf Lebergewebe angewandt, das unter "in vivo" - Bedingungen gewonnen wurde. Unter "in vivo" - Bedingungen wurde ein "Frierstopp des Lebergewebes direkt aus dem Organismus heraus innerhalb von 1 - 3 s" verstanden. Die Metabolitgehalte von ATP und ADP im Mitochondrium und im Cytosol wurden bestimmt.
Neben dem Vergleich der Wirkung verschiedener Narkotika auf die Leber "in vivo" wurden auch Werte ohne Narkotika-Einfluß gemessen. Der ATP/ADP - Quotient in nicht anästhesierten gefütterten Ratten wurde auf 0.9 im Mitochondrium und 6.9 im Cytosol bestimmt. Im Hungerzustand war der mitochondriale ATP/ADP - Quotient erhöht und der cytosolische ATP/ADP - Quotient erniedrigt. Diese Veränderungen konnten durch Wiederfütterung wieder rückgängig gemacht werden. Es wurde eine mögliche Hemmung des Adeninnukleotidtransportes durch langkettige Fettsäure CoA-Ester im Hungerzustand diskutiert, da langkettige Fettsäure CoA-Ester im Hungerzustand erhöht sind.

Der mitochondriale ATP/ADP - Quotient lag stets höher als in der isoliert perfundierten Leber und niedriger als bei isolierten Hepatocyten. Ein Grund für diese Differenz könnten Unterschiede in der Sauerstoffversorgung der Zellen in den verschiedenen Systemen sein.

6. Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
CoA	Coenzym A
CS	Citratsynthase
Hb	Hämoglobin
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
3-PGK	3-Phosphoglyceratkinase

7. L i t e r a t u r a n g a b e n

Akerboom, T.P.M., Bookelman, H., Zuurendonk, P.F., Van der Meer, R. & Tager, J.M. (1978) Eur. J. Biochem. 84, 413-420

Akerboom, T.P.M., Van der Meer, R. & Tager, J.M. (1979) Methods Life Sci. B 205, 1-33

Chance, B. & Hollunger, G. (1963) J. Biol. Chem. 238, 418-431

Elbers, R., Heldt, H.W., Schmucker, P., Soboll, S. & Wiese, H. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 378-393

Ernster, L., Dallner, G. & Azzone, G.F.(1963) J.Biol. Chem. 238, 1124-1131

Faupel, R.P., Seitz, H.J., Tarnowski, W., Thiemann,W. & Weiss, C. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 148, 509-522

Harris, R.A., Farmer, B. and Ozawa, T. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 150, 199-209

Heldt, H.W., Klingenberg, M. & Milovancev, M. (1972) Eur. J. Biochem. 30, 434-440

Ji, S., Lemasters, J.J.& Thurman, R.G. (1980) FEBS Lett. 113, 37-41

Klingenberg, M. & Pfaff, E. (1966), in Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. & Slater, E.C., eds.), Vol. 7, 180 - 201, American Elsevier Publishing Company, New York

Klingenberg, M. (1975) in Energy Transformation in Biological Systems, 105-121, ASP, Amsterdam

Lerner, E., Shug, A.L., Elson, C. & Shrago, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1512-1519

Matschinsky, F.M., Hintz, C.S., Reichlmeier, K., Quistorff, B. & Chance, B. (1978) in Microenvironments and Metabolic Compartmentation (Srere, P.A. & Estabrook, R.W., eds.), 149-166, Academic Press, New York

Mitchell, P. (1963) Biochem. Soc. Symp. 22, 142-168

Morel, F., Lauquin, G., Lunardi, J., Duszynski, J. & Vignais, P.V. (1974) FEBS Lett. 39, 133-138

Pande, S.V. & Blanchaer, M.C. (1971) J. Biol. Chem. 246, 402-411

Reinauer, H. & Hollmann, S. (1966) Anästhesist 15, 327-332

Scholz, R., Schwarz, F. & Bücher, Th. (1966) Z. Klin. Chemie 4, 179-189

Scholz, R., Hansen, W. & Thurman, R.G. (1973) Eur. J. Biochem. 38, 64-72

Scholz, R. & Bücher, Th. (1965) in Control of Energy Metabolism (Chance, B., Estabrook, R.W. & Williamson, J.R., eds.) 393-414, Academic Press, New York, London

Seitz, H.J., Müller, M.J., Krone, W. & Tarnowski,W. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 183, 647-663

Severinghaus, J.W. (1965) Blood Gas Concentrations, in Handbook of Physiology, Respiration II, 1475, Amer. Physiol. Soc., Washington

Shug, A.L., Lerner, E., Elson, C. & Shrago, E. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 559-563

Siess, E.A. & Wieland, O.H. (1976) Biochem. J. 156, 91-102

Sies, H. (1977) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 1021-1032

Soboll, S., Scholz, R., Freisl, M., Elbers, R. & Heldt, H.W. (1976) in Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J.M., Söling, H.D. & Williamson, J.R. eds.), 29-40, Elsevier/ North-Holland, Amsterdam

Soboll, S., Scholz, R. & Heldt, H.W. (1978) Eur. J. Biochem. 87, 377-390

Soboll, S., Akerboom, T.P.M., Schwenke, W.D., Haase, R. & Sies, H. (1980) Biochem. J. 192, 951-954

Vaartjes, W.J., Kemp Jr., A., Souverijn, J.H.M. & Van den Bergh, S.G. (1972) FEBS Lett. 23, 303-308

Van Kampen, E.J. & Zijlstra, W.G. (1961) Clin. Chim. Acta, 6, 538-544

Vignais, P.V. & Duée, E.D. (1966), Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 1169 - 1187

Wojtczak, L. & Zaluska, H. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 76-81

Wollenberger, A., Ristau, O. & Schoffa, G. (1960) Pflügers Arch. 270, 399-412

Zuurendonk, P.F. & Tager, J.M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 333, 393-399

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 1980 bis Dezember 1981 am Institut für Physiologische Chemie I, Universität Düsseldorf, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Sies danke ich dafür, daß er die Promotion ermöglichte und großzügig unterstützte.

Frau Priv. Doz. Dr. S. Soboll danke ich herzlich für die vorzügliche Anleitung und Betreuung während der Anfertigung der Dissertation.

Herrn T.P.M. Akerboom danke ich für viele fruchtbare Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. H.J. Seitz und seinen Mitarbeitern danke ich für die Unterstützung bei der Gewinnung des Lebergewebes in vivo.

Frau S. Gründel und Frau B. Zimmer danke ich für ihre tatkräftige Hilfe bei den experimentellen Arbeiten.

L e b e n s l a u f

Am 19.10. 1957 wurde ich, Wolfgang- Dietrich Schwenke, als Sohn des Diplom- Ingenieurs Walter Schwenke und seiner Ehefrau Hildegard Schwenke, geb. Wendler, in Essen geboren.
Von 1964 - 1967 besuchte ich dort die Grundschule und anschließend das Gymnasium Goetheschule. 1972 wechselte ich auf das Musische Gymnasium Essen-Werden, an dem ich am 1. Juni 1976 die Reifeprüfung bestand.
Ab 1. Juli 1976 leistete ich beim Stabsmusikcorps der Bundeswehr meinen Wehrdienst ab.
Im Juli 1977 verstarb nach langer Krankheit mein Vater.
Seit Oktober 1977 studiere ich Zahnmedizin an der Universität Düsseldorf, wo ich 1978 das Vorphysikum, 1980 das Physikum ablegte.
Im April 1980 begann ich am Institut für Physiologische Chemie I mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353